

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑨ Patentschrift
⑩ DE 198 02 540 C 1

⑤ Int. Cl.⁵:
C 12 N 5/08
// A61K 39/39

⑦ Aktenzeichen: 198 02 540.8-41
⑧ Anmeldetag: 23. 1. 98
④ Offenlegungstag: -
④5 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 19. 11. 98

32

DE 198 02 540 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:
Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg,
79106 Freiburg, DE

⑦4 Vertreter:
Lederer, Keller & Riederer, 80538 München

⑦2 Erfinder:
Simon, Jan, Dr., 79249 Merzhausen, DE; Termeer,
Christian, Dr., 79117 Freiburg, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 44 12 794 A1

- ⑤4 Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen mit niedermolekularen Fragmenten der Hyaluronsäure
- ⑤7 Offenbart wird ein Verfahren zur Anreicherung von dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:
- a) aus Blut werden mononucleäre Zellen gewonnen,
 - b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
 - c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
 - d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, um die irreversible Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

DE 198 02 540 C 1

Die Bereitstellung von dendritischen Zellen (DZ) erlangt bei der Therapie von verschiedenen Erkrankungen eine immer größer werdende Bedeutung. Mit Hilfe der dendritischen Zellen ist es möglich, hochaktive Immunmodulatoren bereitzustellen, die mit verschiedenen Antigenen, insbesondere Tumorantigenen, Viruspeptiden oder allergen wirkenden Verbindungen beladen werden können. Diese Zellen werden dann in der adoptiven Immuntherapie bei Patienten mit Tumoren, Viruserkrankungen oder Allergien eingesetzt. Es besteht daher in der adoptiven Immuntherapie ein erheblicher Bedarf an dendritischen Zellen, wobei diese dendritischen Zellen vorzugsweise über standardisierte, reproduzierbare und kostengünstige Verfahren bereitgestellt werden sollen. Diese Verfahren müssen unter GMP-/GLP-Bedingungen durchgeführt werden können.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zur Erzeugung von dendritischen Zellen aus Stammzellen bekannt (beispielsweise DE 44 12 794 A1).

Aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut von mit Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) behandelten Chemotherapie-Patienten können hämatopoetische Stammzellen isoliert werden, die den Oberflächenmarker CD34 aufweisen. Diese Stammzellen werden unter Zugabe verschiedener Zytokine kultiviert und die dendritischen Zellen werden nach einer verhältnismäßig langen Kultivierungszeit erhalten.

Bei einem anderen Verfahren werden Monozyten aus peripherem Blut isoliert, die mit GM-CSF und IL-4 kultiviert werden. Zur vollständigen Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen müssen am Ende der Differenzierungsphase weitere Zytokine zugesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren weisen verschiedene Nachteile auf. Die verhältnismäßig lange Kultivierungsdauer ist für den Einsatz in der Klinik nicht geeignet. Darüber hinaus können die hohen Kosten der Zytokine und die Chargenabhängigkeit der eingesetzten Zytokine nachteilig sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Anreicherung von ausgereiften dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:

- a) aus Blut werden mononukleäre Zellen gewonnen,
- b) Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
- c) die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
- d) die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, um die Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.

Mononukleäre Zellen können aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten gewonnen werden, wobei in bevorzugter Ausführungsform ein Leukozytenkonzentrat über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgetrennt wird.

In dem zweiten Verfahrensschritt werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen angereichert, bevorzugt mit Hilfe von wenigstens einem gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper. Zum Einsatz kommen können hier die Magnet-aktivierte Zell-Sortierung (MACS) oder die Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sortierung (FACS). Eine einfachere, jedoch nicht so effiziente Methode stellt die Anreicherung über Plastikadhäsion dar.

Anschließend werden die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist. Gegebenenfalls können noch weitere geeignete Zytokine zugesetzt werden.

Schließlich werden die in dem Kultivierungsschritt erhaltenen Zellen mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, wobei diese Fragmente 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen. Ein Grundbaustein stellt ein Aminodisaccharid aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in 61-3-glycosidischer Bindung dar. Bevorzugt eingesetzt werden Hyaluronsäurefragmente mit jeweils 1 bis 10 Grundbausteinen.

Die Kultivierung der den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen erfolgt in einem Medium, das GM-CSF und IL-4 enthält, bevorzugt für eine Dauer von wenigstens 72 h bis 7 Tagen. Hieran schließt sich die Kultivierung in Schritt d) für wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten an. Die Hyaluronsäurefragmente liegen bevorzugt in einer Konzentration von 1 bis 50 µg/ml und besonders bevorzugt in einer Konzentration von 10 bis 30 µg/ml vor.

Die vorliegende Erfindung betrifft also die Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten für die Ausreifung von dendritischen Zellen.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können dendritische Zellen hergestellt bzw. angereichert werden. Die dendritischen Zellen sind Antigen präsentierende Zellen, die auf die Initiation der primären Immunantwort spezialisiert sind. In den verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung übernehmen sie unterschiedliche Funktionen. In dem unreifen Zustand sind die dendritischen Zellen sehr effektiv beim Prozessieren von nativen Protein-Antigenen für den MHC Klasse II-Weg. Reife dendritische Zellen sind dagegen weniger für die Aufnahme von neuen Proteinen für die Präsentation geeignet, stimulieren aber dafür viel besser die ruhenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich des Wachstums und der Differenzierung.

In vivo läuft die Reifung der dendritischen Zellen dann ab, wenn die unreifen dendritischen Zellen von den Stellen der Antigenaufnahme zu den T-Zell-Bereichen der lymphoiden Organe wandern. In vitro kann die Reifung in Kulturen von frisch isolierten dendritischen Zellen beobachtet werden. Die Reifung der dendritischen Zellen schlägt sich auch in Änderungen der Morphologie und des Phänotyps nieder. Die Charakterisierung und Differenzierung der dendritischen Zellen erfolgt üblicherweise über den Nachweis verschiedener Oberflächenmarker.

Aufgrund der natürlichen Funktionen sind die dendritischen Zellen besonders geeignet, als natürliches Adjuvans bei der Impfung und Immuntherapie, insbesondere bei der Tumorthherapie, eingesetzt zu werden. Dabei ist es für den angestrebten therapeutischen Einsatz entscheidend, ausgereifte DZs zu verwenden, die sich nach Reinfusion in den Patienten nicht wieder zu Makrophagen-ähnlichen Vorstadien zurückdifferenzieren können.

Man geht nach derzeitigem Wissensstand davon aus, daß die dendritischen Zellen im unreifen Zustand das Antigen

beispielsweise ein Antigenreichtum aufnehmen und anschließend das Antigen prozessieren. Dabei reifen die dendritischen Zellen und wandern zu den T-Zell-reichen Bereichen der sekundären lymphatischen Organe. Reife dendritische Zellen exprimieren in hohem Maße MHC, co-stimulierende Moleküle und Adhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche, wodurch eine Interaktion zwischen den dendritischen Zellen und den T-Zellen ermöglicht wird (T-cell clustering). Co-stimulatorische Signale werden über B7-CD28 und CD40-CD40-Liganden-Interaktionen übertragen und durch die Produktion von Zytokinen, wie IFN- α , IFN- γ und IL-12, die bekannterweise die zellulär vermittelte Immunität fördern, verstärkt.

Nach derzeitigem Wissensstand scheint es wesentlich zu sein, daß für die Induktion von primärer T-Zellantwort spezialisierte Antigen-präsentierende Zellen vorhanden sind, da die Präsentation von Antigenen an T-Zellen in Abwesenheit eines zweiten Signals (Co-Stimulation) entweder das Absterben der T-Zellen oder eine Antigen-spezifische Toleranz bewirken kann.

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens sind daher insbesondere darin zu sehen, daß die dendritischen Zellen relativ einfach bereitgestellt werden können. Außerdem müssen nur verhältnismäßig geringe Konzentrationen an kostspieligen Zytokinen eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Bereitstellung einer Zellpopulation, die ganz überwiegend aus dendritischen Zellen besteht und, die sich in einem verhältnismäßig einheitlichen (synchronen) Reifungszustand befinden. Wenn die dendritischen Zellen für die Präsentation von Antigenen eingesetzt werden sollen, können die geeigneten Antigene zu einem geeigneten Zeitpunkt zu den dendritischen Zellen zugegeben werden und die Antigene können dann von den dendritischen Zellen im Laufe des Reifungsprozesses prozessiert werden. Die Antigene können entweder als Proteine, in Form von abgetöteten Zellen oder Zellpräparationen oder auch in Form von gentechnologisch modifizierten Zellen zugegeben werden. Wenn sich die dendritischen Zellen in dem gewünschten Zustand befinden, können sie für die Therapie verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist für die Bereitstellung von autologen dendritischen Zellen geeignet. Der Begriff "autolog" bedeutet, daß die Ausgangszellen einem Spender (Patienten) entnommen werden. Diese Zellen werden dann in vitro erfindungsgemäß behandelt, um dendritische Zellen zu gewinnen. Die angereicherten dendritischen Zellen werden dann gegebenenfalls nach Kontakt mit dem Antigen demselben Spender, von dem sie ursprünglich herkommen, zurückgegeben.

Alternativ hierzu kann das Verfahren auch für die Bereitstellung von "allogenen" dendritischen Zellen verwendet werden. Hierbei werden die Zellen von einem Spender oder auch aus Blutkonserven, die von Blutspendediensten erhalten werden können, hergestellt und dann an andere Empfänger zurückgegeben. Hierdurch können standardisierte dendritische Zellen bereitgestellt werden, die beispielsweise optimal mit einem Tumorantigen beladen sind. Insbesondere bei viralen Infektionen (HIV) kann so die zelluläre Immunität effektiv gesteigert werden.

Erfindungsgemäß werden zur Ausreifung der dendritischen Zellen Fragmente von Hyaluronsäure (HA) eingesetzt. Die Hyaluronsäure ist ein makromolekulares Polysaccharid, das als körpereigene Substanz vor allem in der Dermis zur Wasserspeicherung dient. Hyaluronsäure wird vor allem von Keratinozyten in den basalen Schichten der Oberhaut (Epidermis) sowie von Fibroblasten des Unterhaut-Bindegewebes produziert. Hyaluronsäure findet sich auch im Glaskörper von Augen, der Synovialflüssigkeit der Gelenke und ist ein Bestandteil des Bindegewebes. Bei niedrigen Konzentrationen bildet Hyaluronsäure eine hochviskose wäßrige Lösung. Die Hyaluronsäure ist eine hochmolekulare Verbindung mit einem Molekulargewicht zwischen 50000 Dalton und mehreren Millionen Dalton. Der Grundbaustein der Hyaluronsäure ist ein Aminodisaccharid, das aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-Glucosamin in β 1-3-glycosidischer Bindung besteht. Dieser Grundbaustein ist mit der nächsten Einheit β 1-4-glycosidisch verbunden. Diese unverzweigte Kette der Hyaluronsäure besteht aus etwa 2000 bis 10000 derartiger Grundeinheiten. Durch Hyaluronidasen werden β -glucosidische Bindungen hydrolysiert und die Hyaluronsäure wird so zu kleineren Bruchstücken abgebaut. Erfindungsgemäß werden bevorzugt die Hyaluronidase aus Bullenhoden oder die aus *Streptococcus hyaluronicus* isolierte Hyaluronidase verwendet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Hyaluronsäurefragmente werden bevorzugt zunächst mechanisch durch Scherkräfte und/oder Ultraschall zerkleinert und anschließend erfolgt ein weiterer Abbau des Polysaccharids mit Hilfe einer geeigneten Hyaluronidase. Die gewünschten Fragmente mit bevorzugt 1 bis 50 Grundeinheiten werden anschließend durch geeignete Trennverfahren isoliert.

Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgend beschriebenen Beispiele weiter erläutert. Bei der Durchführung der Beispiele wurde besonders auf Verunreinigungen der Reagenzien mit Lipopolysacchariden (LPS) geachtet. Lipopolysaccharide sind Bestandteile aus der Zellwand Gramnegativer Bakterien. Schon kleinste Verunreinigungen mit Lipopolysacchariden reichen aus, um Monozyten bzw. CD14⁺-Stammzellen des peripheren Blutes irreversibel zu aktivieren. Daher wurde bei den erfindungsgemäß durchgeführten Versuchen darauf geachtet, einen Schwellenwert von 0,01 ng/ml Lipopolysaccharid zu unterschreiten, der erfahrungsgemäß keinen Einfluß auf Monozyten, CD14⁺-Stammzellen oder dendritische Zellen hat.

Beispiel 1: Zellisolation

a) Gewinnung von mononukleären Zellen (PBMC)

Ein Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) von einem gesunden, humanen Spender wurde über einem Dichtegradienten mit Ficoll-Hyperpaque plus (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durch Zentrifugation aufgetrennt. Die mononukleären Zellen (PBMC) lagern sich dabei in der Interphase des Gradienten ab, rote Blutkörperchen (Erythrozyten) sowie neutrophile Granulozyten befinden sich unter dem Gradienten und wurden verworfen. Ficoll-Hyperpaque plus ist ein Gemisch von makromolekularen Zuckern zellulärer Herkunft, ist aber vom Hersteller auf den LPS-Gehalt getestet (Endotoxin-Gehalt > 0,001 ng/ml). Dieser Wert konnte in eigenen Tests bestätigt werden.

b) Markierung der CD14-positiven Zellen

Zur weiteren Aufreinigung der Monozyten wurden die PBMC für 45 min. mit anti-CD 14-mAK inkubiert. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert. MACS[®] (Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach) = Magnetic activated Cell sorting. Eine Methode zur Aufreinigung von Zellen über an Metall-

zugewaschen, gebundene Antikörper. Markierte Zellen bleiben in der magnetischen Säulenmatrix hängen. [PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco) mit 5 mM Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA) und Rinder-Serumalbumin (BSA; pH 7,2 durch Zugabe von HCl eingestellt). Durch Zugabe von EDTA wird das Klumpen der Zellen verhindert, was wichtig für die Autreinigung in der Säule ist. Nun wurden die Zellen mit 50 μl Ziege-anti-Maus-IgG Microbeads unter den gleichen Bedingungen inkubiert, anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

c) Anreicherung der CD14-positiven Zellen über MACS

Die Anreicherung erfolgte bei 4°C. Die VS + P^2 Säule wurde in den MACS-Magneten (beides Miltenyi) eingesetzt und zunächst mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die Zellen durch ein Zellsieb (30 μm Maschenweite; Miltenyi) passiert und auf die Säule aufgetragen. Die Negativfraktion aus unmarkierten Zellen, die magnetisch nicht in der Säulenmatrix festgehalten wurden, liefen durch und wurden verworfen. Die Säule wurde noch zweimal mit jeweils 5 ml MACS-Puffer gewaschen, um eine möglichst reine Positivfraktion zu erhalten. Anschließend wurde die Säule aus den Magneten genommen und die spezifisch über Microbeads in der Matrix festgehaltenen Zellen unter Druck mit 5 ml Puffer in ein steriles Röhrchen gespült. Die erhaltenen Zellen wurden in der Neubauerkammer ausgezählt. In der Regel konnten durch diese Methode aus einem Buffy-coat $3 \cdot 5 \times 10^7$ CD14-positive Zellen (Monozyten) gewonnen werden, mit einer Reinheit > 90%. Diese Zellen lassen sich vollständig durch Zytokinzugabe in DZ umwandeln.

Beispiel 2: Zellkultur

Die isolierten CD14-positiven Zellen wurden in 12 ml c-RPMI [cRPMI: "RPMI 1640" (Gibco, Paisley, Schottland) mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin), alle Bestandteile enthalten weniger als 0,025 internationale Endotoxineinheiten/ml (Richtwert für Aqua ad injectabilia) aufgenommen. Um sie zu dendritischen Zellen (DCs) ausreifen zu lassen, wurde ihnen humanes GM-CSF für die klinische Anwendung (Leukomax 400[®], Sandoz AG, Nürnberg) in einer Konzentration von 8000 Einheiten/ml Medium und IL-4 (Genzyme, Rüsselsheim, Charge auf LPS-Gehalt getestet: < 0,001 ng/ml) in einer Konzentration von 500 Einheiten/ml Medium zugegeben. Dann wurde die Zellsuspension in einer Six-Well-Plate zu jeweils 2 ml ausgespiet und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Am vierten Tag wurden nochmals 2 ml/well c-RPMI mit GM-CSF und IL-4 dazugegeben.

Beispiel 3: Hyaluronsäurepräparationen

a) Fraktionierung von Hyaluronsäure und Auftrennung der Fragmente

Aufgereinigte Hyaluronsäure (HA) aus Hahnenkämmen (Healon[®]; Pharmacia, für den klinischen Einsatz bestimmt, Endotoxin-Gehalt > 0,001 ng/mg) wurde zunächst mit einem Ultraschallgerät (Branson Sonifier) für 2 min. in größere Bruchstücke gespalten. Um diese Bruchstücke weiter zu zerkleinern, wurde ihnen Hyaluronidase (Typ 1 aus Rinderhoden; Sigma) zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Natriumacetat auf pH 5 eingestellt, bei 37°C für 12 Std. inkubiert und anschließend durch Erhitzen auf 90°C inaktiviert. Die erhaltenen Fragmente wurden nun nach ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden sie in einer 1,5 m langen Glassäule auf ein Polyacrylamidgel (Bio-Gel P-10, Bio-Rad, München) geschichtet. Als Spüllüssigkeit diente Aqua bidestillata, unter der Säule nahm ein Fraktions-sammler (Pharmacia) alle 20 min. die Fraktionen auf. Die Röhrchen wurden verschlossen, kühl und lichtgeschützt gelagert.

b) Detektion der Größe der Hyaluronsäurefragmente

1. größere Bruchstücke nach Ultraschallzerkleinerung

Sonifizierte HA wurde in einem 5%igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Polysaccharid-banden wurden im Gel durch Färbung mit Stains-all (3,3'-Diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbo-cyanin; Sigma) sichtbar gemacht. Die so erhaltenen Fragmente haben eine Größe von 10.000 bis 50.000 kDa.

2. kleine Fragmente nach zusätzlicher Hyaluronidaseverdauung

ANTS-Markierung:

Zunächst mußten die einzelnen Proben mit dem Fluorophor ANTS markiert werden [ANTS-Lösung: 0,15 M 8-Aminonaphtalen-1,3,6-Trisulfonsäure Dinatriumsalz in Essigsäure/Wasser (3/17, v/v), durch langsames Erhitzen auf 60°C gelöst]. ANTS markiert jedes Zuckermolekül am Kettenende. Die kleinen Fragmente wurden ebenfalls mittels Gelelektrophorese unter Verwendung eines 30 Acrylamidgels aufgetrennt. Das Gel konnte nun unter UV-Licht (ANTS-Farbstoff) sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

c) Quantitative Bestimmung der Hyaluronsäurekonzentration nach der Fragmentierung und Auftrennung

Es wurden von jeder Probe 0,1 ml abgenommen und im Eisbad mit 0,6 ml Färbelösung (5,2 g di-Natrium-Tetraborat in 1 l konzentrierter Schwefelsäure) gemischt. Nun wurden jeweils 0,02 ml 0,1% Carbazol in Ethanol zugegeben, gemischt und abermals 10 min. lang gekocht. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur konnte die HA-Konzentration photometrisch bei 520 nm bestimmt werden. Als Leerwert diente Aqua dest., als Standard 0,2 μM HA/ml in Aqua dest.

Beispiel 4: Zellstimulation

Zur Stimulation wurden den Zellen am vierten Tag der Kultivierung unterschiedliche HA-Fragmente in einer Konzentration von 0,025 ng/ml (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) Medium zugesetzt. Als Positivkontrolle dienten Lipopolysaccharide (LPS) von *Escherichia coli* Serotyp 0177 (Sigma).

Um die vermehrte Expression von Oberflächenmarkern funktionell darzustellen, wurden die DZ vorstimuliert und für 5 Tage mit aufgereinigten naiven antigenen T-Zellen inkubiert, die ebenfalls aus Leukozytenkonzentrat (butty coats) gewonnen wurden, sog. mixed leukocyte reaction (MLR). Je nach stimulatorischer Kapazität der DZ's kommt es dabei zu mehr oder weniger ausgeprägter T-Zellproliferation, die mittels Einbau von radioaktivem ^3H -Thymidin bestimmt wurde. Bis wurden die radioaktiven Counts per minute (CPM) der einzelnen Proben dargestellt, die direkt mit der stattgefundenen T-Zellproliferation korrelieren. Man sieht, daß DZ's, die mit kleinen HA-Fragmenten behandelt wurden, deutlich potentere APC's sind, vergleichbar mit dem für LPS-Stimulation erhaltenen Wert (dargestellt in Tabelle 4B).

Auch dieses Beispiel belegt, daß erfindungsgemäß mit kleinen HA-Fragmenten zwischen 2-12 UDP-Zuckermolekülen eine deutliche Ausreifung von DC erhalten wird, die durchaus vergleichbar ist mit publizierten Daten anderer Methoden. Eine strenge Abhängigkeit von einem einzelnen Zucker erscheint unwahrscheinlich, jedoch haben größere Moleküle (20-30 UDP-Zucker) offensichtlich keinen Einfluß, da die erfindungsgemäß eingesetzten Fraktionen keine Unterschiede in der Wirkung zeigen, auch wenn sie größere Fragmente enthalten. Geschaltete HA hat ebenfalls keinen Effekt.

Beispiel 6

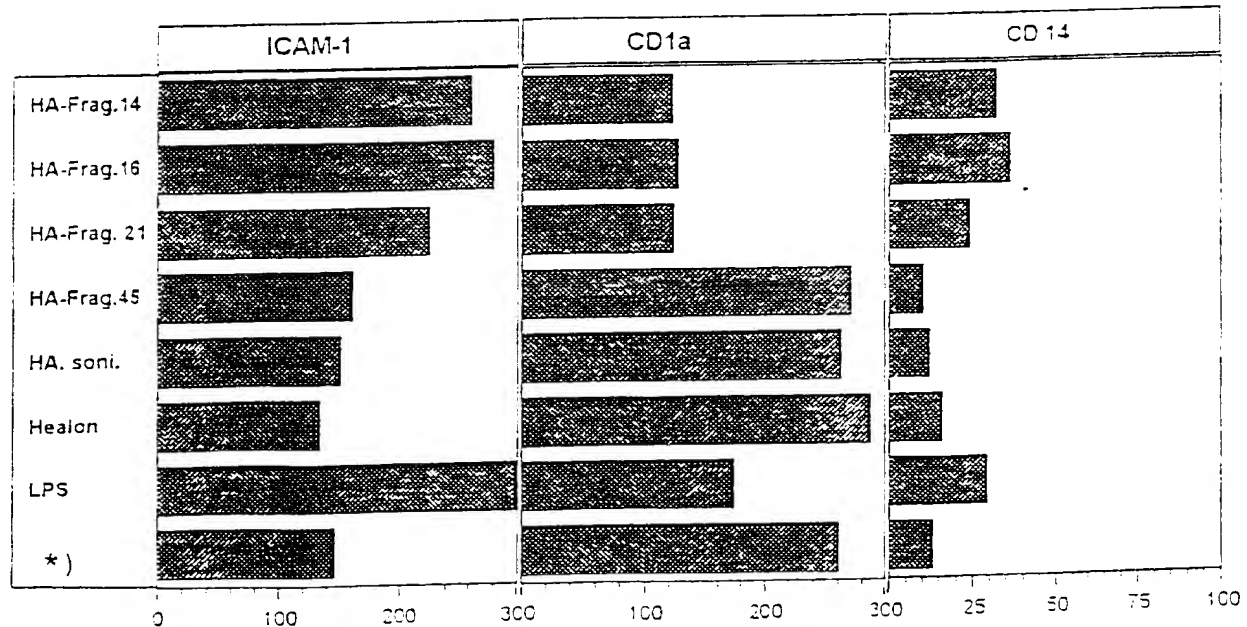
Interessanterweise ist der erfindungsgemäße Effekt offensichtlich spezifisch für DZ's, da mit Interferon-gamma ($\text{IFN}\gamma$) behandelte Monozyten, die zu Makrophagen ausreifen, keine Steigerung ihrer stimulatorischen Kapazität nach Behandlung mit HA-Fragmenten zeigen (siehe Tabelle 4A).

Ergebnisse:

- 1) Auftrennung der erhaltenen Fragmente mittels Gelelektrophorese und ANTES-Färbung. Die erfindungsgemäß verwendeten Fragmente weisen eine Größe von 2 bis hin zu 12-fach-Zuckern auf. Die Konzentrationsmessung ergab Werte von etwa 1 mg/ml gesplittene HA. Eine weitere Aufspaltung dieser Fraktion in einzelne Zucker ist prinzipiell mittels einer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) möglich. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß besonders die kleinen Fragmente für die Stimulation verantwortlich sind.
- 2) Einfluß der DC-Stimulierung mittels HA-Fragmenten auf die Expression von Oberflächenmarkern.

Über die FACS Abbildungen kann die Oberflächendichte verschiedener Rezeptoren mittels Antikörper festgestellt werden. Integriert man die Fläche unter den Kurven, erhält man die sogenannte MFI (Mean fluorescence intensity). Diese Werte sind in der Tabelle 1 für verschiedene Rezeptoren aufgelistet.

Tabelle 1

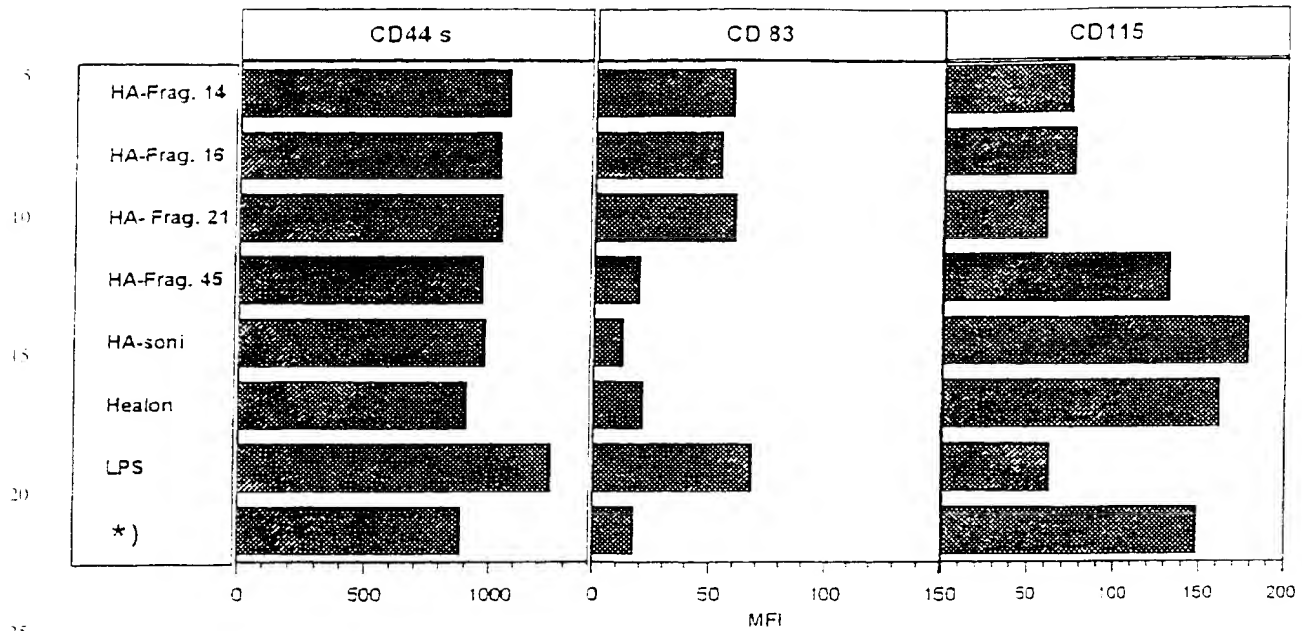


*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Zur Bedeutung der einzelnen, in Tabelle 1 aufgeführten Oberflächenmarker:

ICAM-1 ist ein fast ubiquitär vorkommendes InterCelluläres AdhäsionsMolekul. Die Ergebnisse zeigen eine leichte Aufregulation, wie sie bei verschiedensten Arten der Zellaktivierung beobachtet wird. CD1a ist ein Marker für dendritische und Langerhanszellen der Haut; während Monozyten ausschließlich CD14 exprimieren, kommt es im Laufe der Ausreifung immer mehr zum Verlust von CD14 und Expression von CD1a. LPS, HA-Fragmente und MCM-Medium drängen diesen Prozeß wieder leicht zurück. Funktionelle Konsequenzen dieser Regulation sind aber nicht bekannt.

Tabelle 2:

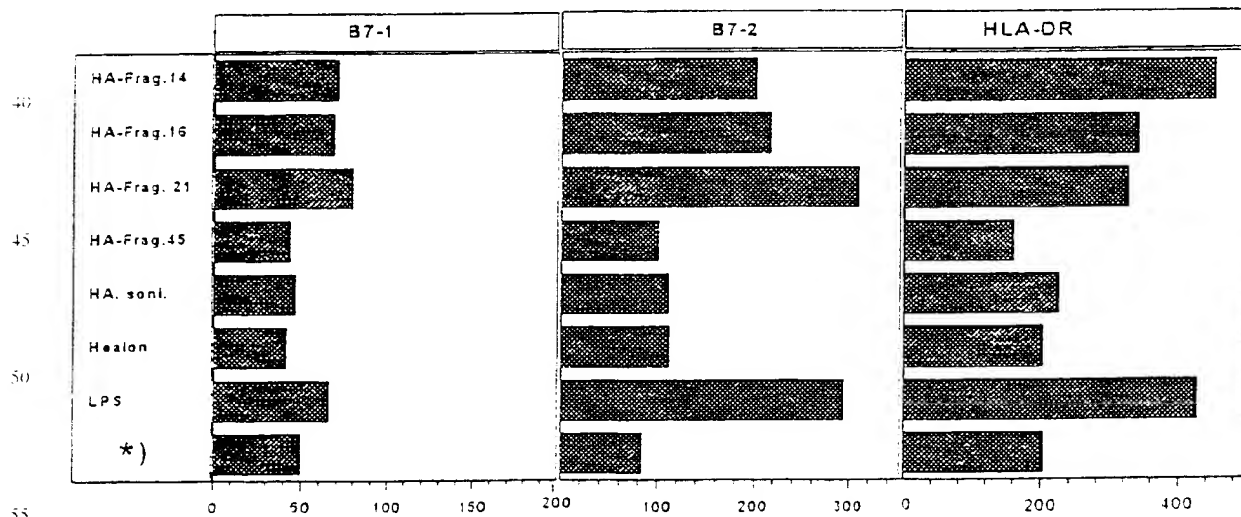


*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 2 zeigt die Stimulierung anderer Oberflächenmarker (CD44s, CD83 und CD115). Weiteres Anzeichen der DZ-Ausreifung sind eine Herunterregulation von CD115 (dem G-CSF Rezeptor) sowie eine Aufregulation von CD83, eine funktionelle Relevanz dieser Veränderungen ist noch nicht bekannt. In der Tabelle 2 ist deutlich zu sehen, daß die Kriterien der DZ-Ausreifung durch Stimulation mit kleinen HA-Fragmenten voll erfüllt werden.

CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, eine beschriebene Funktion ist die Bindung von HA.

Tabelle 3

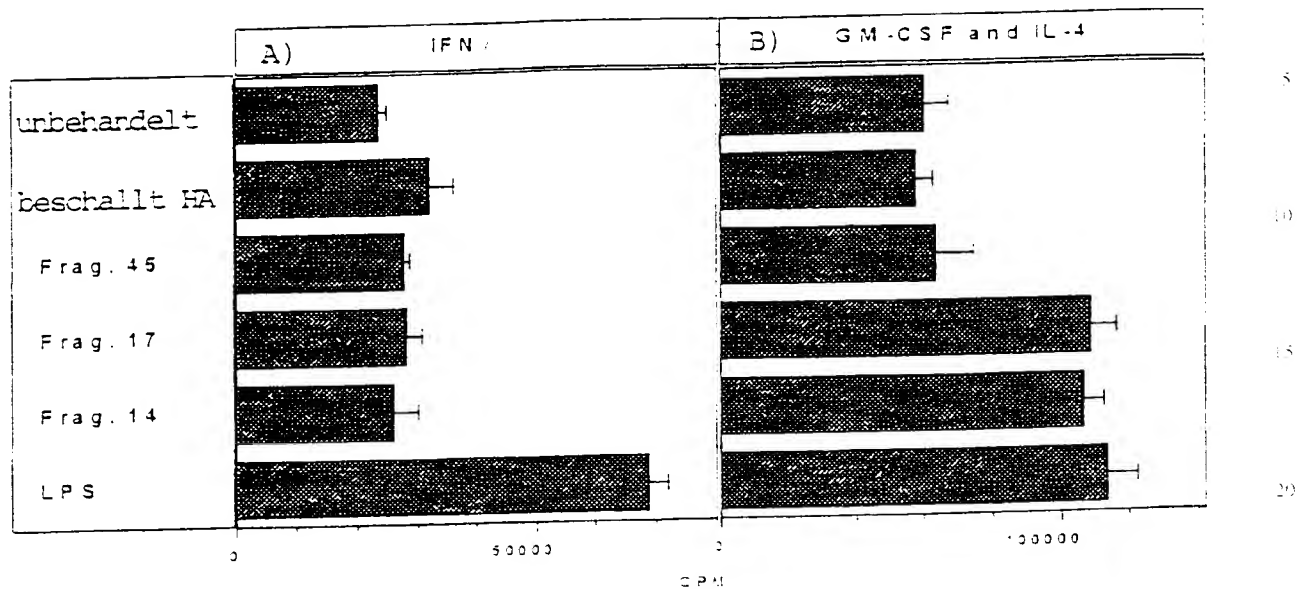


*) unbehandelte unreife DZ's, Tag 4

Tabelle 3 zeigt die Expression von weiteren Oberflächenmarkern.

Neben den Reifungsmarkern sind hier Faktoren dargestellt, die für die Funktion der Antigen-Präsentation, d. h. der Stimulation von T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle spielen. Hierzu zählen das MHC Klasse II Molekül HLA-DR sowie die beiden kostimulatorischen Faktoren B7-1 und B7-2. Ohne die Aufregulation dieser Faktoren ist auch ein Einsatz der DZ in den oben beschriebenen Anwendungen nicht sinnvoll. Ertindungsgemäß wurde eine deutliche Aufregulation aller Faktoren nach Behandlung mit HA-Fragmenten gefunden, vergleichbar mit der maximalen Stimulation nach LPS-Gabe.

Tabelle 4



Frag. 45: In der Gelelektrophorese kein Nachweis von kleinen HA-Fragmenten, im Uronsäure-Assay weniger als 0,001 mg HA = Negativfraktion zum Ausschluß einer Wirkung von Säulenbestandteilen.

Frag. 17: In der Gelelektrophorese liegen die größten nachweisbaren Banden bei ca. 16-fach Zuckern, stark vertreten sind Zucker bis zu einer Größe von 6-fach Zucker. Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Frag. 14: Gelelektrophorese: bis ca. 22-fach Zucker, starke Banden bis 10-fach Zucker, Uronsäure-Assay: 1 mg/ml.

Patentansprüche

- Verfahren zur Anreicherung von dendritischen Zellen, das folgende Schritte umfaßt:
 - aus Blut werden mononucleäre Zellen gewonnen,
 - Zellen, die den Oberflächenmarker CD14 aufweisen, werden angereichert,
 - die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen werden in einem Medium kultiviert, das die Zytokine GM-CSF und IL-4 beinhaltet, und
 - (die in Schritt c) erhaltenen Zellen werden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert, um die irreversible Ausreifung der Zellen zu dendritischen Zellen zu veranlassen.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die mononucleären Zellen aus Blut mit Hilfe eines Dichtegradienten, insbesondere eines Ficoll-Dichtegradienten aus einem Leukozytenkonzentrat gewonnen werden.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen mit Hilfe wenigstens eines gegen den Oberflächenmarker CD14 gerichteten Antikörper angereichert werden.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14 aufweisenden Zellen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF in einer Konzentration von 5000 bis 10000 U/ml und IL-4 in einer Konzentration von 100 bis 1000 U/ml aufweist.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden, die 1 bis 50 Grundbausteine der Hyaluronsäure aufweisen, wobei der Grundbaustein ein Aminosäurebaustein aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in β 1-3-glykosidischer Bindung ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hyaluronsäurefragmente jeweils 1 bis 10 Amino-
disaccharide aufweisen.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die den Oberflächenmarker CD14
aufweisenden Zellen zwischen 72 Stunden und 7 Tagen in einem Medium kultiviert werden, das GM-CSF und IL-4
enthält.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen in Schritt d) für
wenigstens 48 Stunden mit Hyaluronsäurefragmenten kultiviert werden.
9. Verwendung von niedermolekularen Hyaluronsäurefragmenten für die Anreicherung von dendritischen Zellen.

PTO 03-1964

German

Document No. DE 198 02 540 C1

Process for the Production of Dendritic Cells
with Low-Molecular Fragments of Hyaluronic Acid
[Verfahren zur Herstellung von dendritischen Zellen
mit niedermolekularen Fragmenten der Hyaluronsäure]

Dr. Jan Simon and Dr. Christian Termeer

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Washington, D.C.

March 2003

Translated by: Schreiber Translations, Inc.

Country : Germany

Document No. : DE 198 02 540 C1

Document Type : Patent Application Laid Open
to Inspection

Language : German

Inventors : Dr. Jan Simon and Dr.
Christian Termeer

Applicants: : Klinikum der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg

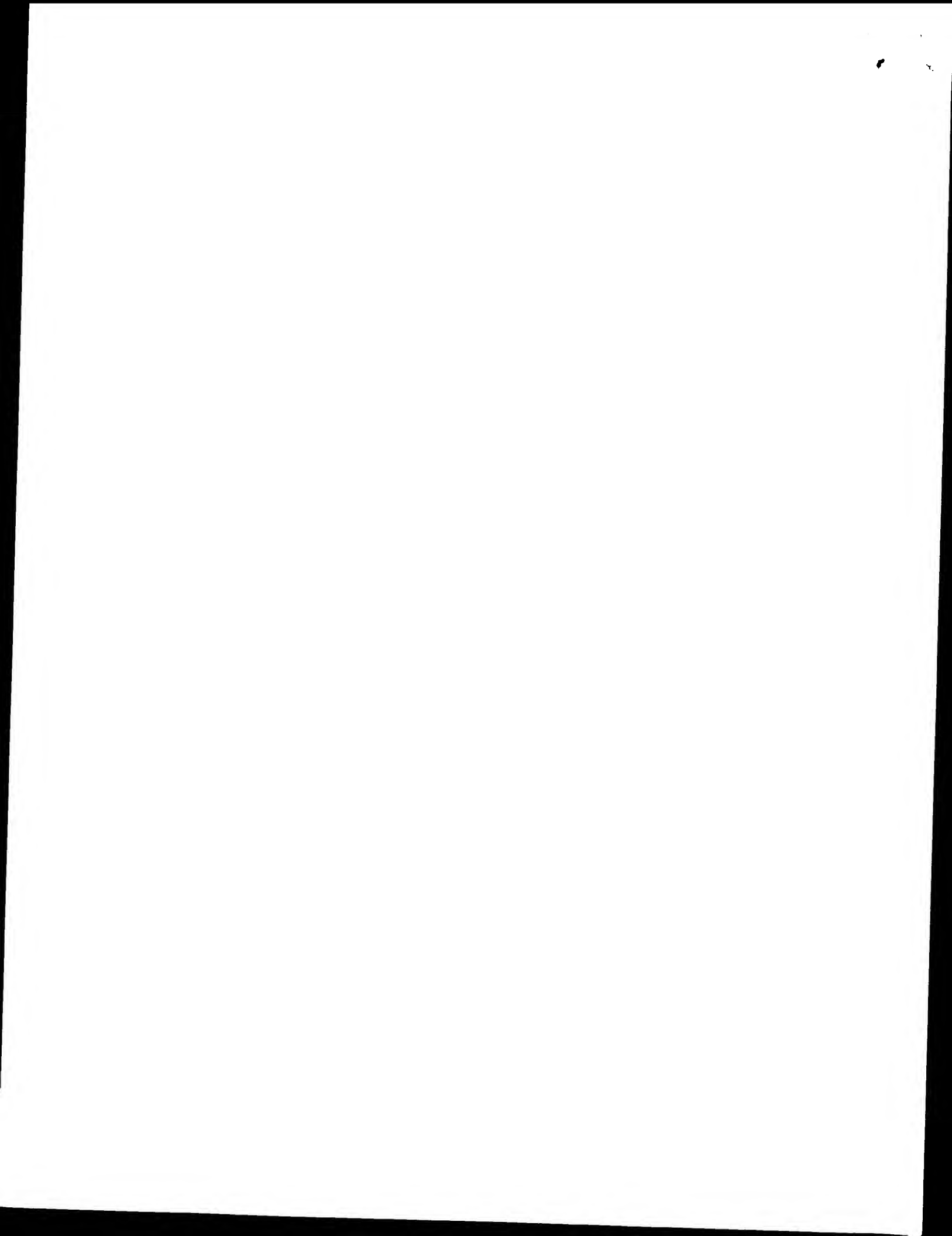
IPC : C 12 N 5/08,
// A61K 39/39

Application Date : January 23, 1998

Publication Date : November 19, 1998

Foreign Language Title : Process for the Production of
Dendritic Cells with Low-
Molecular Fragments of
Hyaluronic Acid

English Language Title : Verfahren zur Herstellung von
dendritischen Zellen mit
niedermolekularen Fragmenten
der Hyaluronsäure



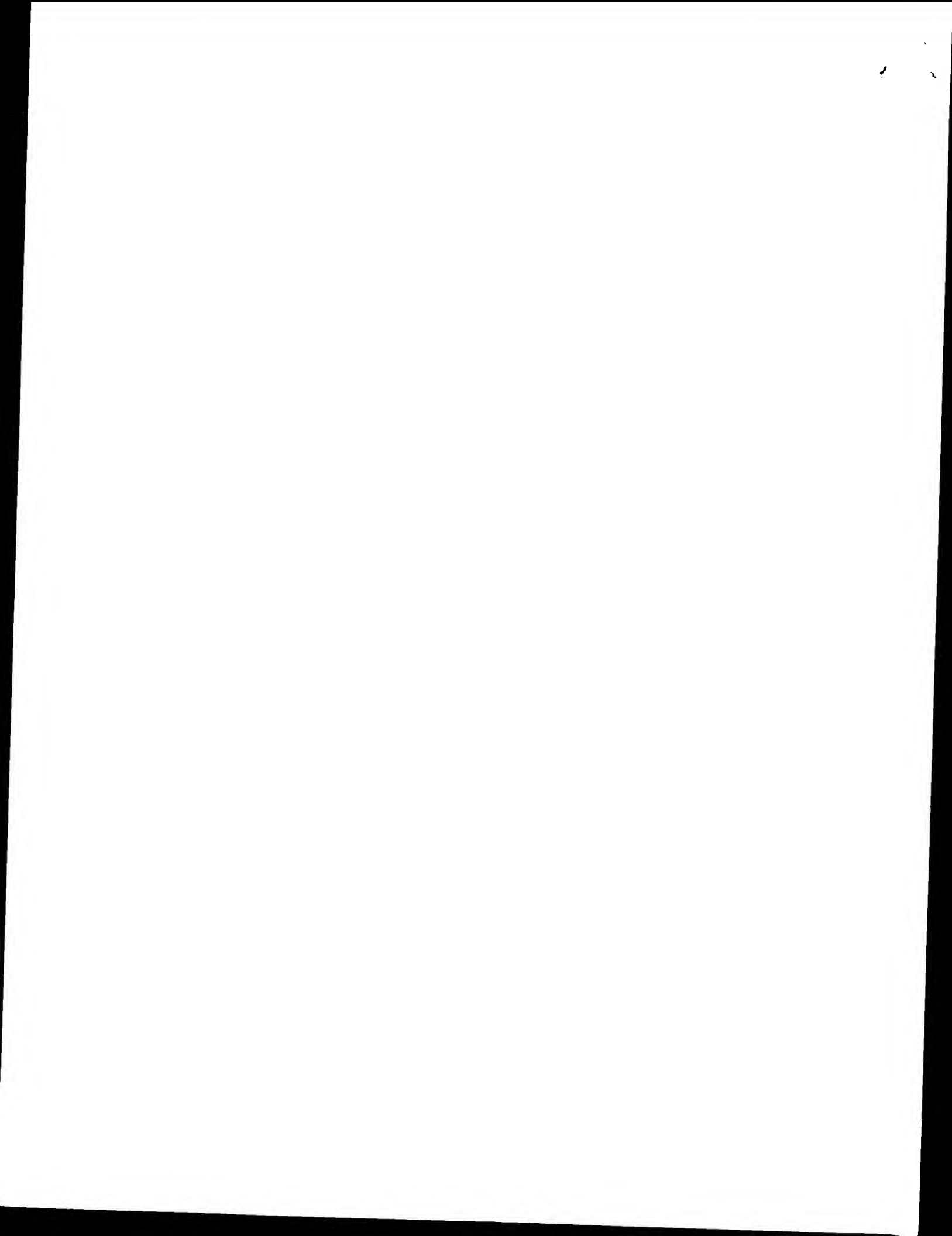
Specification

The supply of dendritic cells (DZ) assumes ever-greater significance in the therapy of various diseases. With the help of dendritic cells, it is possible to supply highly active immune modulators that can be charged with various antigens, in particular, tumor antigens, virus peptides or compounds with an allergenic effect. These cells are then used in adoptive immune therapy in patients with tumors, virus diseases or allergies. There is therefore a considerable need for dendritic cells in adoptive immune therapy and these dendritic cells are to be supplied preferably via standardized, reproducible and reasonably priced processes. It must be possible to perform these processes under GMP/GLP conditions.

The state of the art offers various processes for the production of dendritic cells from stem cells (for example, DE 44 12 794 A1).

Hematopoietic stem cells can be isolated and they display the surface marker CD34 from the bone marrow or the peripheral blood of chemotherapy patients treated with G-CSF factor [granulocyte colony stimulating factor]. These stem cells are

¹ Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.



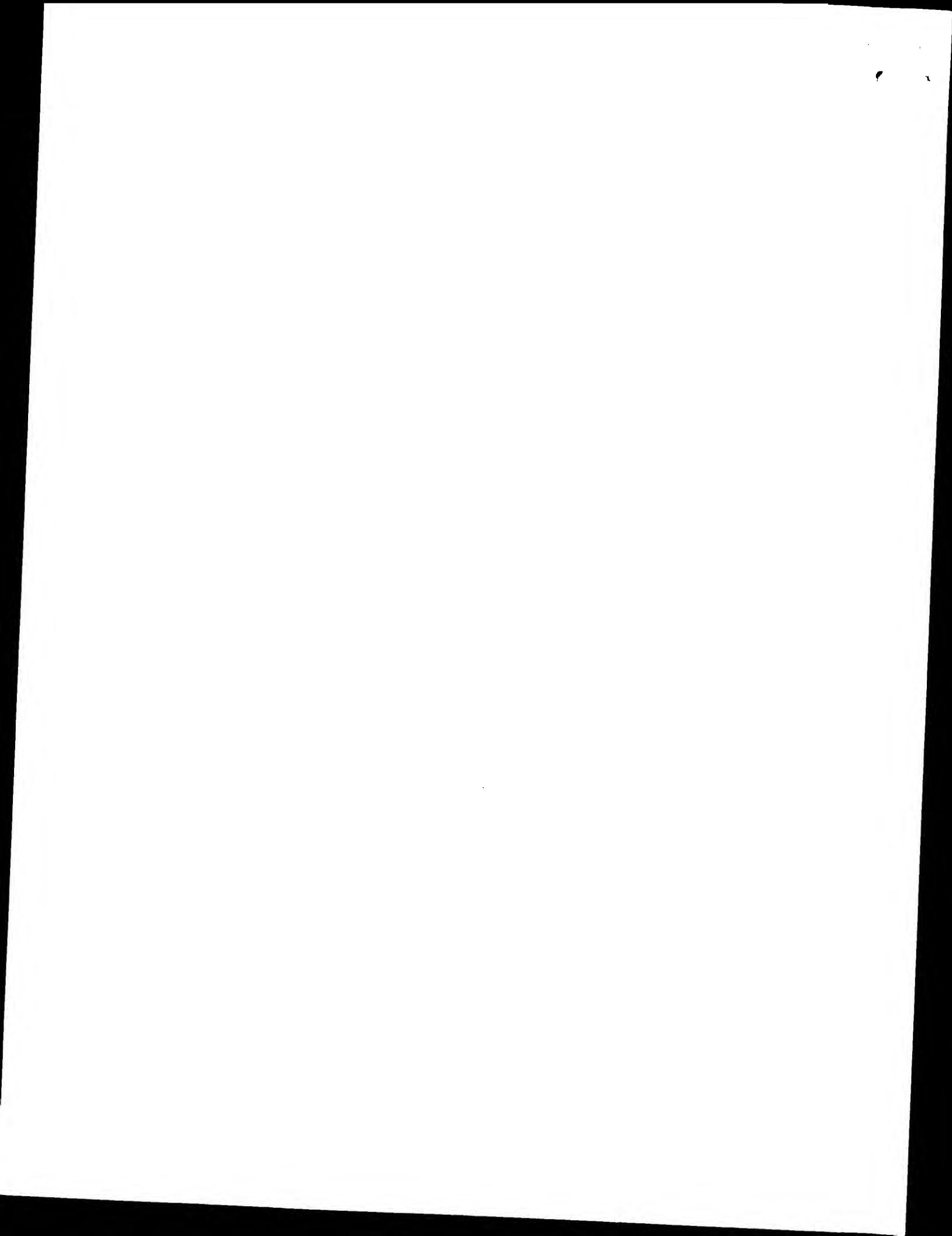
cultivated by adding various cytokines and the dendritic cells are obtained after a comparatively long cultivation time.

In another process, monocytes that are cultivated with GM-CSF and IL-4 are isolated from peripheral blood. Additional cytokines must be added in order to achieve the complete maturation of the cells into dendritic cells at the end of the differentiation phase.

Processes known from the state of the art present various disadvantages. The comparatively long cultivation time is not suitable for use in a clinical environment. Moreover, the high costs of cytokines and the dependence of the cytokines used on the charges can turn out to be disadvantageous.

The object of this invention therefore is a process for the enrichment of mature dendritic cells comprising the following steps:

- a) mononuclear cells are obtained from the blood;
- b) cells that display the surface marker CD14 are enriched;
- c) the cells that display the surface marker CD14 are cultivated on a medium that contains the cytokines GM-CSF and IL-4 and
- d) the cells, obtained in step c), are cultivated with hyaluronic acid fragments to cause the ripening of the cells into dendritic cells.



Mononuclear cells can be obtained from the blood with the help of a density gradient where, in a preferred embodiment, a leukocyte concentrate is separated via a Ficoll density gradient.

In a second process step, the cells displaying the surface marker CD14 are enriched, preferably with the help of at least one antibody that is directed against the surface marker CD14. Here one can use magnet-activated cell sorting (MACS) or fluorescence-activated cell sorting (FACS). Enrichment via plastic adhesion is a simpler method which, however, is not as efficient.

Then the cells displaying the surface marker CD14 are cultivated in a medium that displays GM-CSF in a concentration of 5,000 to 10,000 U/ml and IL-4 in a concentration of 100 to 1,000 U/ml. Additional suitable cytokines may possibly be added.

Finally, the cells, obtained during the cultivation step, are cultivated with hyaluronic acid fragments and these fragments display 1 to 50 basic building blocks of hyaluronic acid. A basic building block is an amino disaccharide from D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine in a β 1-3-glycosidic bond. One preferably employs hyaluronic acid fragments with 1 to 10 basic building blocks in each case.

The cells displaying the surface marker CD14 are cultivated in a medium that contains GM-CSF and IL-4, preferably for a duration of at least 72 hours to 7 days. This is followed by cultivation in step d) for at least 48 hours with hyaluronic acid fragments. The hyaluronic acid fragments are preferably pressed in a concentration of 1 to 50 µg/ml and particularly preferably in a concentration of 10 to 30 µg/ml.

The invention at hand thus relates to the use of low-molecular hyaluronic acid fragments for the maturation of dendritic cells.

Dendritic cells can be made or enriched by means of the invention-based process. The dendritic cells are cells that present antigens that are specialized for the initiation of the primary immune response. They assume differing functions during various stages of their development. In the immature state, the dendritic cells are very effective in the processing of native protein antigens for the MHC class II route. On the other hand, dendritic cells are less suitable for the acceptance of new proteins for presentation but, in return, they do a much better job in stimulating the idle CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in terms of growth and differentiation.

Dendritic cells mature in vivo when the immature dendritic cells migrate from the places of antigen acceptance to the T-cell areas of the lymphoid organs. Maturation can be observed

in vitro in cultures of freshly isolated dendritic cells. The maturation of dendritic cells is also expressed via changes in the morphology and the phenotype. The dendritic cells are characterized and differentiated customarily via the detection of various surface markers.

Due to the natural functions, the dendritic cells are particularly suitable for use as natural adjuvant during inoculation and immune therapy, especially in tumor therapy. Here the important thing is to use mature dendritic cells that after reinfusion into the patient cannot again be differentiated back into macrophage-like preliminary stages in order to determine the desired therapeutic employment.

In light of current knowledge, one starts with the idea that the dendritic cells in the immature state absorb the antigen (for example, a tumor antigen) and then process the antigen. The dendritic cells mature in the process and migrate to the areas of the secondary lymphoid organs, which areas are rich in T-cells. Mature dendritic cells to a high degree express MHC, co-stimulating molecules and adhesion molecules on their surface, which facilitates an interaction between the dendritic cells and the T-cells (T-cell clustering). Co-stimulatory signals are transmitted via B7-CD28 and CD40-CD40 ligand interactions and are boosted by the production of

cytokines such as INF- α , INF- γ and IL-12, which, as is known, promote immunity transmitted in a cellular manner. /3

According to the current state of the art, it seems to be essential that specialized antigen-presenting cells are present for the induction of primary T-cell response because the presentation of antigens on T-cells in the absence of a second signal (co-stimulation) can bring about the necrosis of the T-cells or an antigen-specific tolerance.

The advantages of the invention-based process therefore are to be found particularly in the fact that the dendritic cells can be supplied in a relatively simple manner. Besides, one need use only comparatively small concentrations of expensive cytokines. The invention-based process facilitates the supply of a cell population that consists quite overwhelmingly of dendritic cells, which are in a comparatively uniform (synchronous) state of maturation. When the dendritic cells are to be used for the presentation of antigens, then the suitable antigens can be added to the dendritic cells at a suitable moment and the antigens can then be processed by the dendritic cells in the course of the maturation process. The antigens can be added either as proteins in the form of killed cells or cell preparations or also in the form of cells modified by way of gene engineering. When the dendritic cells are in the desired state, they can be used for therapy.

The invention-based process is suitable for the supply of autologous dendritic cells. The concept "autologous" here means that the initial cells are taken from a donor (patient). These cells are then treated in vitro according to the invention in order to obtain dendritic cells. The enriched dendritic cells are then possibly returned after contact with the antigen to the same donor from which they came originally.

As an alternative, the process can also be used for the supply of "allogeneous" dendritic cells. The cells are obtained from a donor or also from stored blood obtained from blood donor services and they are then returned to other recipients. In that way, one can supply standardized dendritic cells that, for example, have an optimum charge of a tumor antigen. In that way, one can effectively increase the cellular immunity, especially in the case of viral infections (HIV).

According to the invention, one uses fragments of hyaluronic acid (HA) for the maturation of the dendritic cells. Hyaluronic acid is a macromolecular polysaccharide that is used as endogenous substance above all in the dermis for the purpose of storing water. Hyaluronic acid is produced above all by keratinocytes in the basal layers of the epidermis as well as of fibroblasts of the subcutis connective tissue. Hyaluronic acid can also be found in the vitreous body of the eyes, the synovial fluid of the joints, and it is a component of the connective

tissue. At low concentrations, hyaluronic acid forms a highly viscous aqueous solution. Hyaluronic acid is a high-molecular compound with a molecular weight of between 50,000 Dalton and several million Dalton. The basic building block of hyaluronic acid is an amino disaccharide that consists of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine in a β 1-3-glycosidic bond. This basic building block is connected β 1-4-glycosidically with the next unit. This unbranched chain of hyaluronic acid consists of about 2,000 to 10,000 such basic units. By means of hyaluronidases, β -glucosidic compounds are hydrolyzed and hyaluronic acid is thus broken down into smaller fragments. According to the invention, one preferably uses the hyaluronidase from bull's testicles or hyaluronidase isolated from *Streptococcus hyaluronicus*. The hyaluronic acid fragments used according to the invention are preferably at first crushed mechanically by shearing force and/or ultrasound and this is followed by a further decomposition of the polysaccharide with the help of a suitable hyaluronidase. The desired fragments with preferably 1 to 50 basic units are then isolated by means of suitable separation procedures.

The invention at hand will be further explained with reference to the examples described below. Particular attention was devoted to contaminations of the reagents with lipopolysaccharides during the performance of the examples.

Lipopolysaccharides are constituents from the cell wall of gram-negative bacteria. Contaminations with lipopolysaccharides are sufficiently in order irreversibly to activate monocytes or CD14⁺ stem cells of the peripheral blood. This is why, in the experiments conducted according to the invention, special attention was devoted to making sure that one did not fall below a threshold value of 0.01 ng/ml which, in light of past experience, does not influence monocytes, CD14⁺ stem cells or dendritic cells.

Example 1: Cell Isolation

a) Obtaining mononuclear cells (PBMC)

A leukocyte concentrate (Buffy coat) from a healthy human donor was separated by means of centrifugation via a density gradient with Ficoll Hyperpaque plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The mononuclear cells (PBMC) here are deposited in the interphase of the gradient, red blood corpuscles (erythrocytes) as well as neutrophile granulocytes are below the gradient and were discarded. Ficoll Hyperpaque plus is a mixture of macromolar sugars of cellular origin, but it was tested by the producer for the LPS content (endotoxin content > 0.001 ng/ml). We were able to confirm this value through our own tests.

b) Marking the CD14-positive cells

The PBMC were incubated for 45 minutes with anti-CD 14-mAK in order further to clean up the monocytes. Then we washed with

PBS and the cell pellet was resuspended in 2 ml of MACS buffer. MACS® (Miltenyi, Biotech, Bergisch Gladbach) = Magnetic activated Cell sorting; a method for cleaning up cells via antibodies bonded to little metal balls; marked cells remain suspended in the magnetic column matrix. (PBS w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco) with 5 mM of ethylene dinitrolotetraacetic acid (EDTA) and bovine serum albumin (BSA); pH 7.2 adjusted by adding HCl). By adding EDTA, one can prevent the clotting of cells, something that is important in the purification of the column,. Now the cells were incubated with 50 μl goat-anti-mouse IgG microbeads under the same conditions, whereupon they were washed with MACS buffer, centrifuged and resuspended in 5 ml of MACS buffer. /4

c) Enrichment of the CD14-positive cells via MACS

Enrichment was done at 4°C. The VS + \oplus column was used in the MACS magnets (both Miltenyi) and were first washed with 5 ml of MACS buffer. To obtain an individual cell suspension, the cells were passed through a cell screen (30 μm mesh width; Miltenyi) and were applied upon the column. The negative fraction from unmarked cells that were not magnetically fixed in the column matrix ran through and were discarded. The column was then washed twice more with 5 ml of MACS buffer each in order to get the purest possible positive fraction. Then the column was taken out of the magnets and the cells that were specifically retained via microbeads in the matrix were flushed

into a sterile tubelet at a pressure of 5 ml of buffer. The resultant cells were counted in the Neubauer chamber. As a rule, it was possible to obtain by means of this method from a Buffy coat $3-5 \times 10^7$ CD14-positive cells (monocytes) with a purity of > 90%. These cells can be completely converted into dendritic cells by adding cytokine.

Example 2: Cell Culture

The isolated CD14-positive cells were absorbed in 12 ml of c-RPMI [(c-RPMI: "RPMI 1640" (Gibco, Paisley, Scotland) with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin streptomycin); all constituents contain less than 0.025 international endotoxin units per ml (standard value for Aqua ad injectabilia). To let them mature into dendritic cells (DCs), we added to them human GM-CSF for clinical use (Leukomax 400[®], Sandoz AG, Nuernberg) in a concentration of 8,000 units/ml of medium and IL-4 (Genzyme, Ruesselsheim, charge tested for LPS content < 0.001 ng/ml) in a concentration of 500 units/ml of medium. Then the cell suspension was pipetted out in a Six-Well plate at 2 ml each and was cultivated in the incubator at 37°C and 5% CO₂. On the fourth day, we once again added 2 ml/well c-RPMI with GM-CSF and IL-4.

Example 3: Hyaluronic Acid Preparations

a) Fractionation of hyaluronic acid and separation of fragments

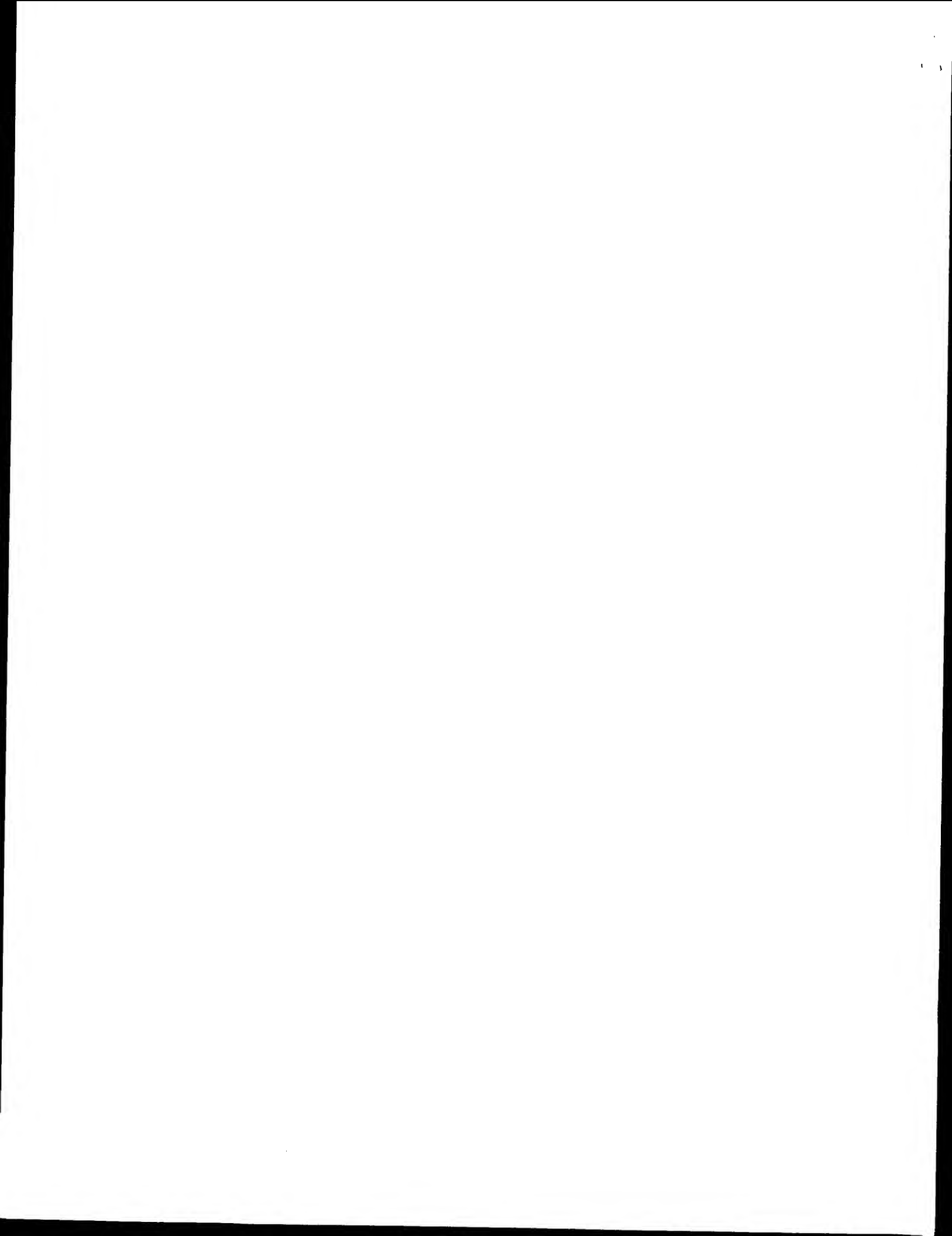
Purified hyaluronic acid (HA) from cockscombs (Healon®; Pharmacia, intended for clinical use, endotoxin content > 0.001 ng/mg) were first separated into larger fragments with an ultrasound unit (Branson Sonifier) for 2 minutes. To comminute these fragments further, we added to then hyaluronidase (Type 1 from bull's testicles; Sigma). The reaction solution was set at a pH of 5 with sodium acetate, it was incubated for 12 hours at 37°C and it was then inactivated by heating to a temperature of 90°C. The resultant fragments were now separated according to their size. For this purpose, they were layered in a glass column with a length of 1.5 m on a polyacrylamide gel (Bio-Gel P-10, Bio-Rad, Munich). Aqua bidestillata was used as flushing fluid, and under the column, a fraction collector (Pharmacia) absorbed the fractions every 20 minutes. The tubelets were sealed and were stored in a cool environment protected against light.

b) Detection of the size of the hyaluronic acid fragments

1. Larger fragments after ultrasound comminution.

Sonified HA was separated in a 5% agarose gel by means of gel electrophoresis. The polysaccharide bands were made visible in the gel by staining with Stains-all (3,3'-diethyl-9-methyl-4,5,4',5'-dibenzothiacarbo-cyanine; Sigma). The resultant fragments have a size of 10,000 to 50,000 kDa.

2. Small fragments after additional hyaluronidase digestion



ANTS marking:

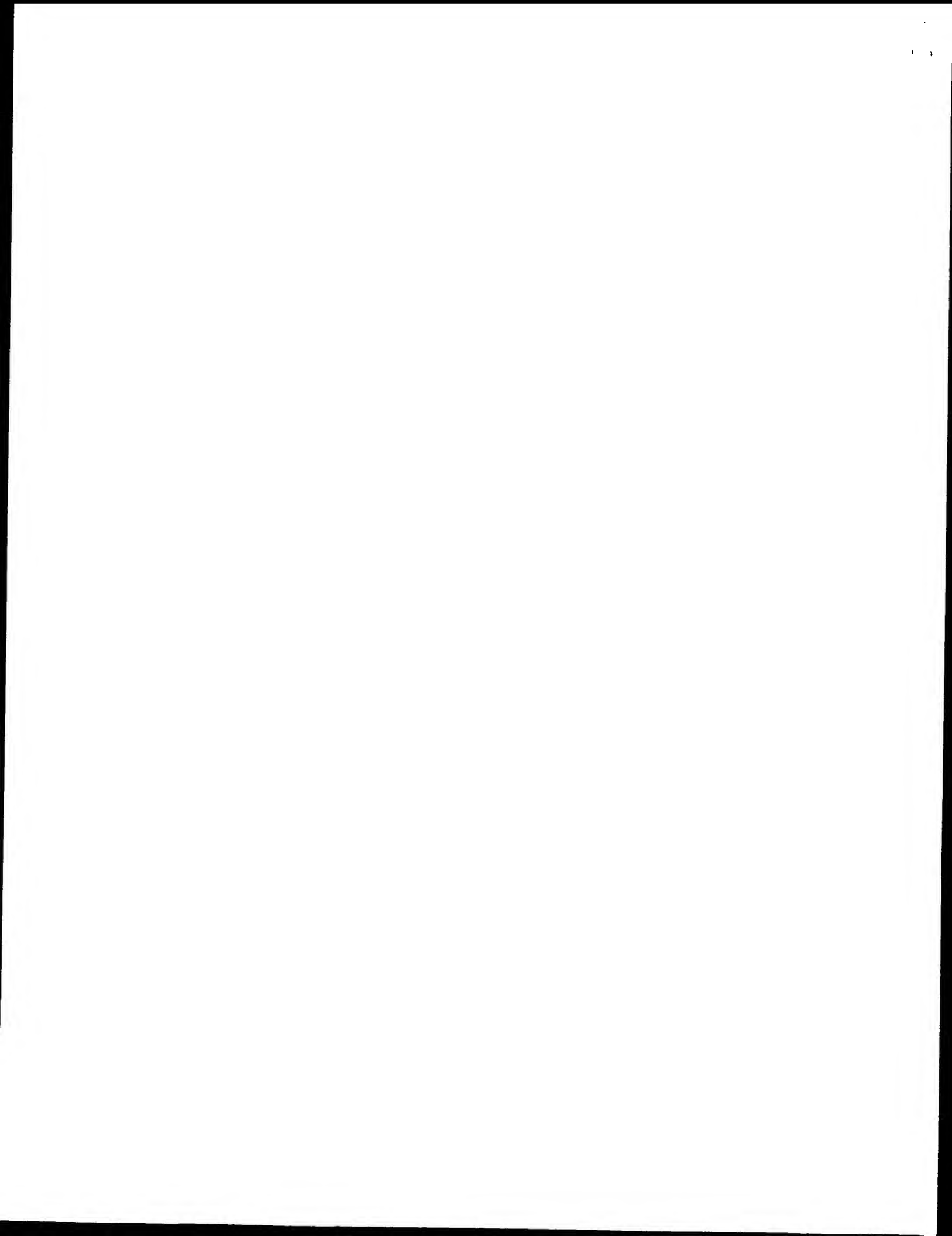
First of all, the individual samples had to be marked with Fluorophor ANTS (ANTS solution: 0.15 M of 8-amino naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid disodium salt in acetic acid/water (3/17, v/v) dissolved by slowly heating to 60°C). ANTS marked each sugar molecule at the end of the chain. The small fragments were also separated by means of gel electrophoresis using a 30 acrylamide gel. The gel was now rendered visible under UV light (ANTS dye) and was documented by photography.

c) Quantitative determination of hyaluronic acid concentration after fragmentation and separation

From each sample, we took 0.1 ml and mixed it in the ice bath with 0.5 ml of dye solution (5.2 g of disodium tetraborate in 1 l of concentrated sulfuric acid). Now we added each time 0.02 ml of 0.1% carbazol in ethanol, we mixed and we once again boiled for 10 minutes. After cooling down to room temperature, it was possible to determine the hyaluronic acid concentration at a figure of 520 nm by means of photometry. Aqua dest. Was used as blank value and, as standard, we used 0.2 μ M HA/ml in Aqua dest.

Example 4: Cell Stimulation

For stimulation we added to the cells on the fourth day of cultivation differing hyaluronic acid fragments in a concentration of 0.025 mg/ml (25 μ g/ml) medium.



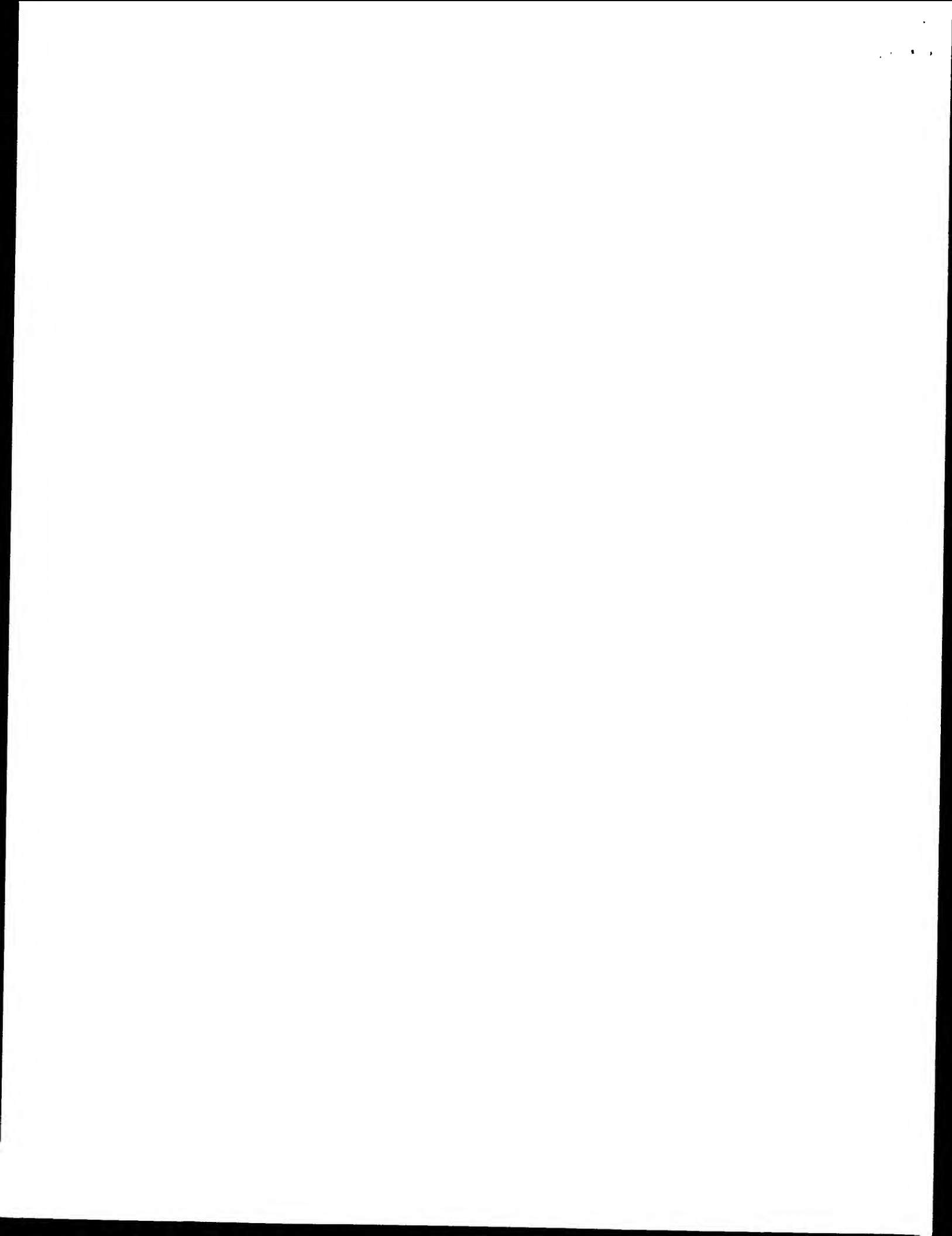
Lipopolysaccharides (LPS) of Escherichia coli Serotype 0177 (Sigma) were used as positive control.

Example 5

/5

In order functionally to illustrate the increased expression of surface molecules, the dendritic cells were prestimulated and were incubated for 5 days with purified naïve [native] allogeneous T-cells that had also been obtained from leukocyte concentrate (buffy coats) (so-called mixed leukocyte reaction, MLR). Depending on the stimulation capacity of the dendritic cells, one winds up with more or less pronounced T-cell proliferation that was determined by incorporating radioactive ^3H -thymidine. We displayed the radioactive counts per minute (Cpm) of the individual samples and they correlate directly with the T-cell proliferation that did take place. One can see that the dendritic cells that were treated with small hyaluronic acid fragments are definitely more potent APC's comparable to the value obtained for LPS stimulation (illustrated in Table 4B).

This example likewise documents that according to the invention one can achieve a definite maturation of the dendritic cells with small hyaluronic acid fragments [of] between 2-12 UDP sugar molecules; this maturation is definitely comparable to data published on other methods. A strict dependence of an individual sugar seems unlikely; although larger molecules (20-



30 UDP of sugar) obviously do not exert any influence because the fractions used according to the invention do not display any differences as far as the effect is concerned even if they contain larger fragments. Sound-treated HA likewise does not have any effect.

Example 6

Interestingly enough, the invention-based effect is obviously specific for dendritic cells because monocytes treated with Interferon-gamma (IFN γ) and maturing into macrophages do not display any increase in their stimulation capacity after treatment with hyaluronic acid fragments (see Table 4A).

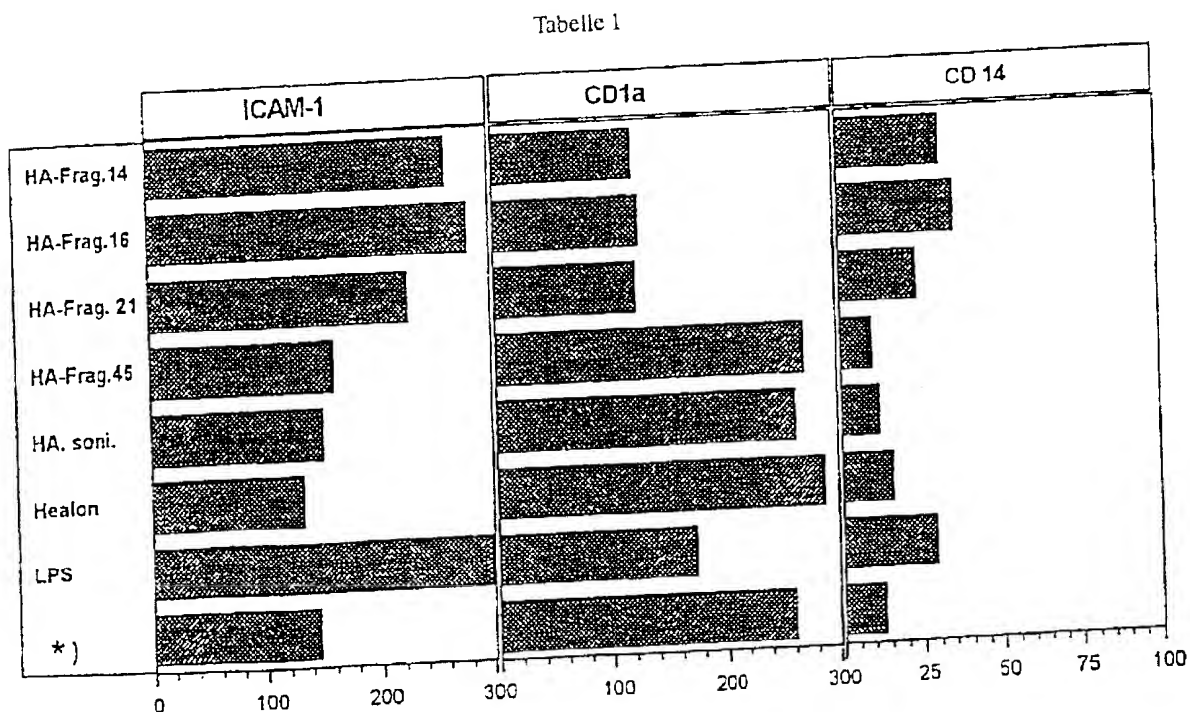
Results:

1) Separation of the resultant fragments by means of gel electrophoresis and ANTS staining. The fragments used according to the invention have a size of 2 all the way to 12-fold sugars. The measurement of the concentration showed values of about 1 mg/ml of separated HA. This fraction can be further separated into individual sugars basically by means of HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography). The results enable us to conclude that it is especially the small fragments that are responsible for stimulation.

2) Influence of DC stimulation by means of HA fragments on the expression of surface markers

The surface density of various receptors can be determined by means of antibodies via the FACS illustrations. If one integrates the surface under the curves, then one gets the so-called MFI (Mean Fluorescence Intensity). These values are listed in Table 1 for various receptors.

Table 1



*) untreated immature dendritic cells, Day 4

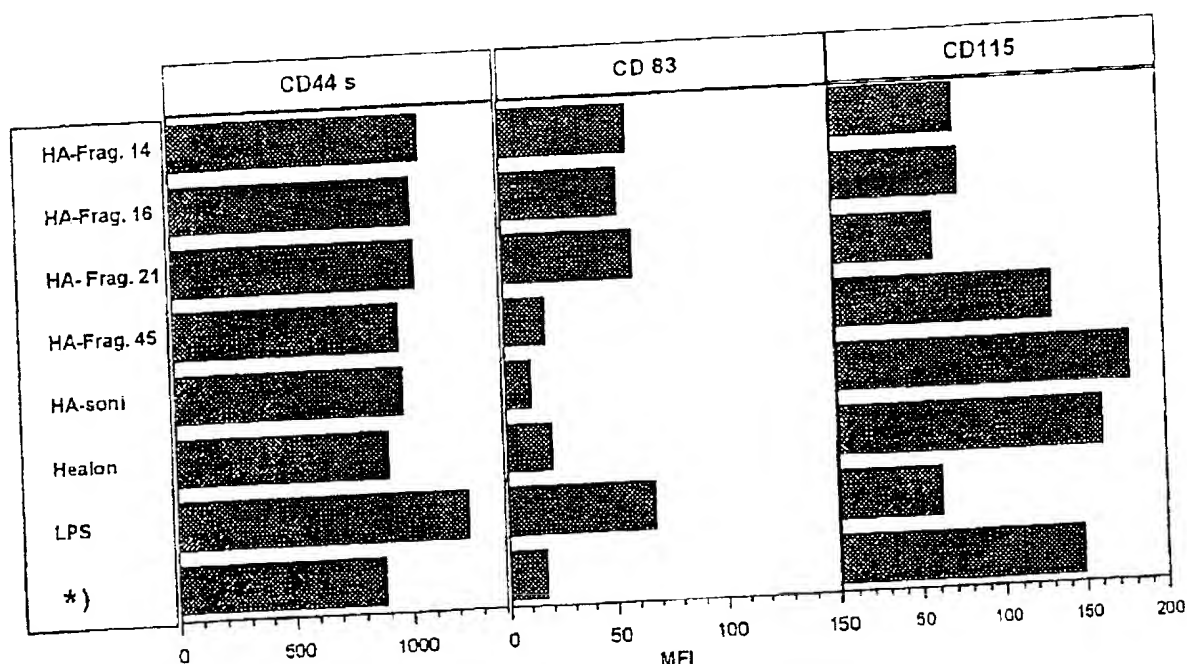
To interpret the individual surface markers listed in Table 1:

ICAM-1 is an almost ubiquitously occurring intercellular adhesion molecule. The results show a slight upward adjustment such as it is observed in various types of cell activation. CD1a is a marker for dendritic and Langerhans cells of the skin; while monocytes exclusively express CD14, there is an ever-

growing loss of CD14 and expression of CD1a during the course of maturation. LPS, HA fragments and MCM medium again push this process slightly further back but functional consequences of this adjustment are not known.

Table 2:

/6



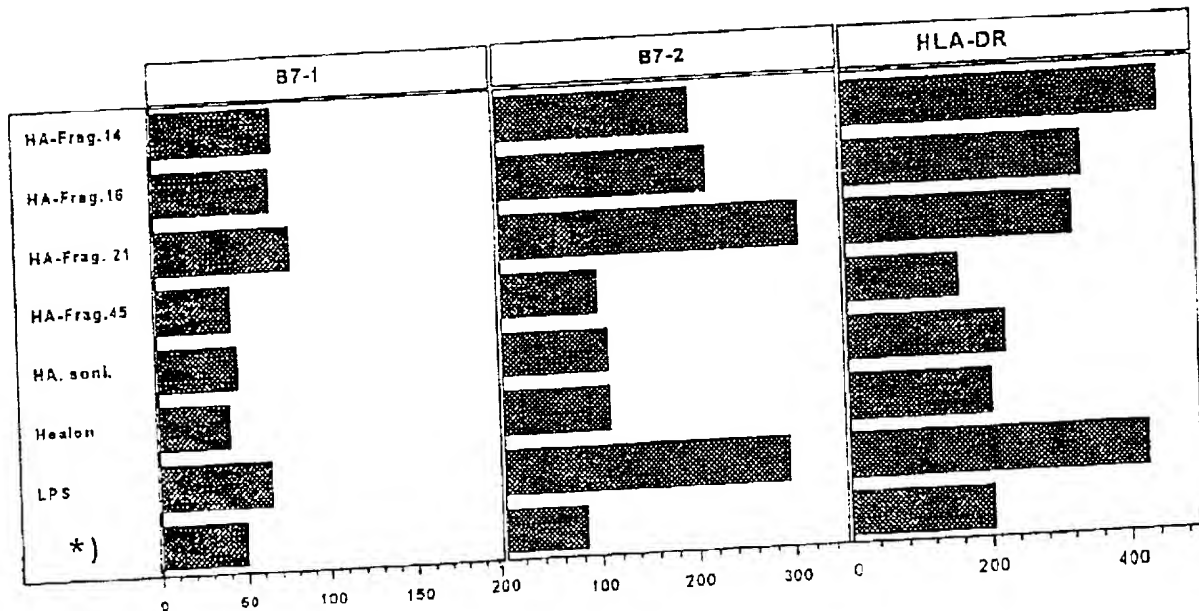
*) untreated immature dendritic cells, Day 4

Table 2 shows the stimulation of other surface markers (CD44s, CD83 and CD115). Other indications of dendritic cell maturation include a downward adjustment of CD115 (the G-CSF receptor) as well as an upward adjustment of CD83, but a functional relevance of these changes is not yet known. Table 2 clearly shows that the criteria of dendritic cell maturation are fully met by stimulation with small hyaluronic acid fragments.

CD44 is an adhesion molecule and a described function is the bonding of HA.

Table 3

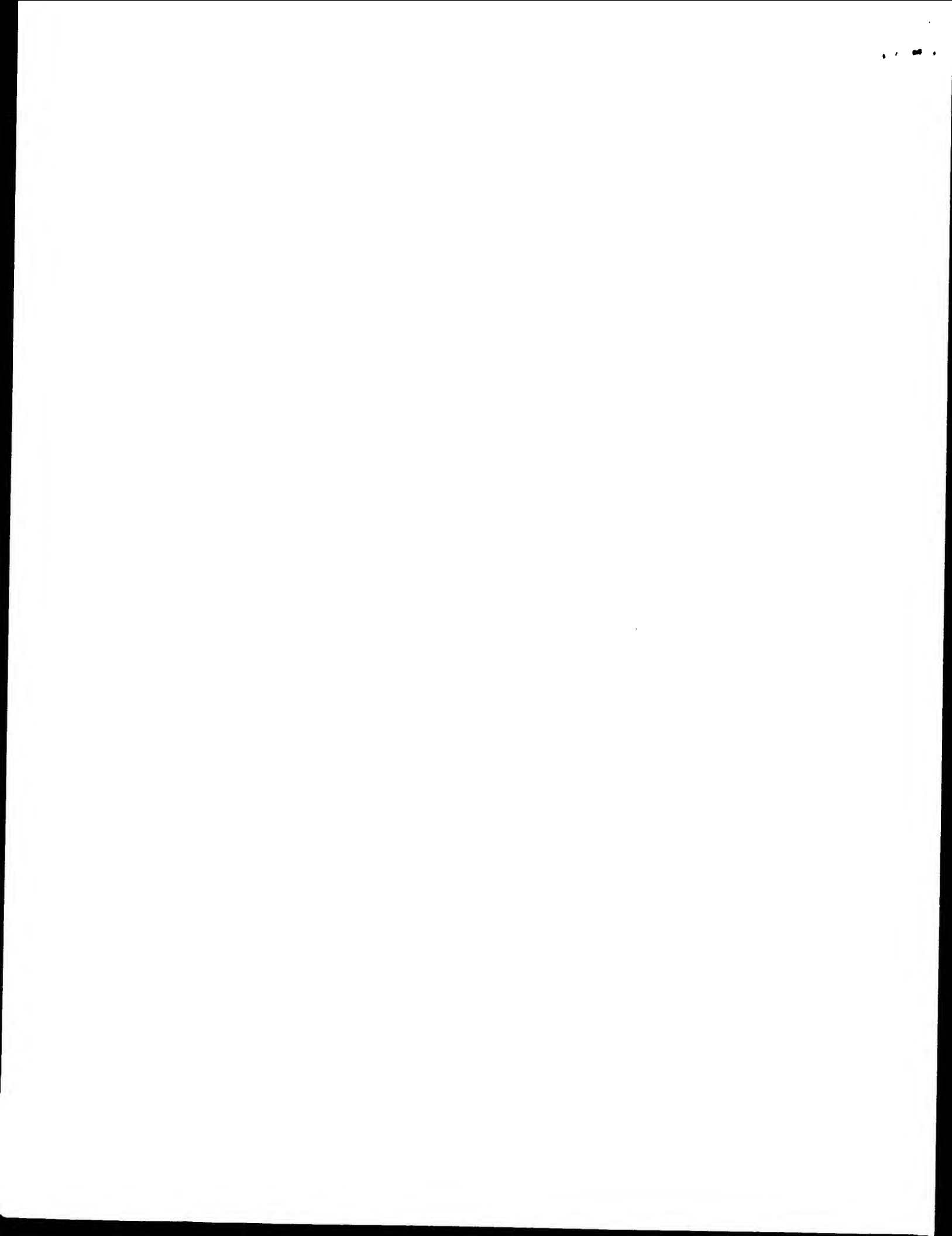
Tabelle 3



*) untreated immature dendritic cells, Day 4

Table 3 shows the expression of additional surface markers.

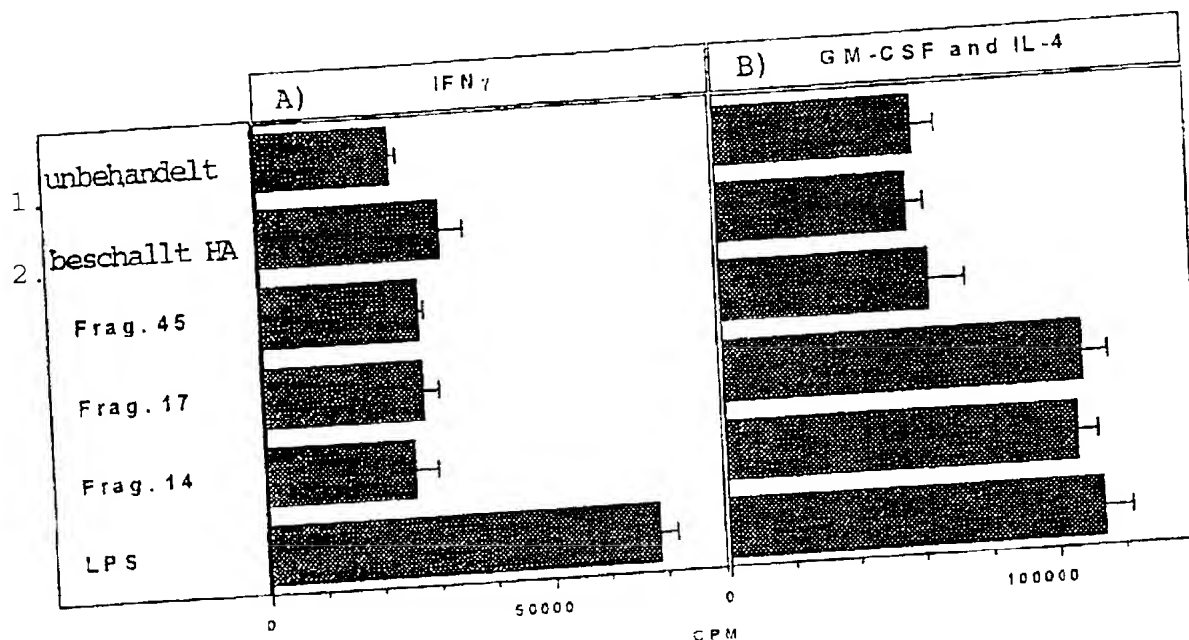
Along with the maturation markers, we can see here the factors that play a decisive role for the function of antigen presentation, that is to say, the stimulation of T-lymphocytes. Here we include the MHC class II molecule HLA-DR as well as the two cost-stimulating factors B7-1 and B7-2. The use of the dendritic cells in the above-described practical applications makes no sense without the upward adjustment of these factors. According to the invention, we found a definite upward adjustment of all factors after treatment with HA fragments



comparable to maximum stimulation after the administration of LPS.

Table 4

/7



[Key: 1) Untreated; 2) Ultrasound-treated HA].

Fragment 45: Gel electrophoresis does not present any evidence as to small HA fragments, the uronic acid assay shows less than 0.001 mg HA = negative fraction so as to rule out any effect deriving from column constituents.

Fragment 17: The largest detectable bands are to be found with about 16 -fold sugars in gel electrophoresis; heavily represented are sugars up to a size of 6 -fold sugar. Uronic acid assay: 1 mg/ml.

Fragment 14: Gel electrophoresis: up to about 22 -fold sugar, strong bands up to 10 -fold sugar, uronic acid assay: 1 mg/ml.

Claims

1. Process for the enrichment of dendritic cells comprising the following steps:

- a) mononuclear cells are obtained from the blood;
- b) cells that display the surface marker CD14 are enriched;
- c) the cells that display the surface marker CD14 are cultivated on a medium that contains the cytokines GM-CSF and IL-4 and

- d) the cells, obtained in step c) are cultivated with hyaluronic acid fragments to bring about the irreversible maturation of the cells into dendritic cells.

2. Process according to Claim 1, characterized in that the mononuclear cells are obtained from blood with the help of a density gradient, in particular, a Ficoll density gradient from a leukocyte concentrate.

3. Process according to one of Claims 1 or 2, characterized in that the cells displaying the surface marker CD14 are enriched with the help of at least one antibody directed against the surface marker CD14.

4. Process according to one of Claims 1 to 3, characterized in that the cells displaying the surface marker CD14 are cultivated in a medium that displays GM-CSF in a concentration of 5,000 to 10,000 U/ml and IL-4 in a concentration of 100 to 1,000 U/ml.

5. Process according to one of Claims 1 to 4, characterized in that the cells in step d) are cultivated with hyaluronic acid fragments that display 1 to 50 basic building blocks of hyaluronic acid where the basic building block is an amino disaccharide from D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine in a β 1-3-glycosidic bond.

6. Process according to Claim 5, characterized in that the hyaluronic acid fragments in each case display 1 to 10 amino disaccharides. /8

7. Process according to one of Claims 1 to 6, characterized in that the cells displaying the surface marker CD14 are cultivated between 72 hours and 7 days in a medium that contains GM-CSF and IL-4.

8. Process according to one of the above claims, characterized in that the cells in step d) are cultivated for a period of at least 48 hours with hyaluronic acid fragments.

9. Use of low-molecular hyaluronic acid fragments for the enrichment of dendritic cells.

